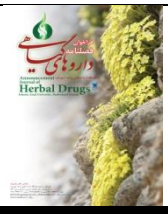


# فصل‌نامه داروهای گیاهی

journal homepage: www.jhd.iaushk.ac.ir


# بررسی اثر شرایط اقلیمی بر غلظت استویوزید در استویای تولید شده در مناطق مختلف ایران و بهینه‌سازی شرایط استخراج استویوزید


**آلاله نیکوئی[۱]، محمد حجت الاسلامی*[۱]، جواد کرامت[۲]،حسین کیانی[۳]**

۱. *گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران؛*

* *مسئول مکاتبات* (**E-mail:** *mohojjat@gmail.com*)

۲. *گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران؛*

۳. *گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران؛*



**شناسه مقاله**

**تاریخ دریافت مقاله:** ۱۳۹۴/۰۵/۱۰

**تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۴/۰۹/۱۰

**نوع مقاله:** علمی - پژوهشی

**موضوع:** گیاهان دارویی

- ✓ *کلید واژگان :*
- ✓ *استویوزید*
- ✓ *استخراج*
- ✓ *کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا*
- ✓ *شرایط اقلیمی*



## چکیده

**مقدمه و هدف:** با توجه به افزایش بیماری‌هایی از جمله دیابت و چاقی امروزه استفاده از جایگزین‌های ساکارز برای تولید محصولات کم کالری و بدون قند مورد توجه پژوهشگران و صنعتگران قرار گرفته است. در این میان استویوزید با شیرینی ۳۰۰ برابر نسبت به ساکارز با توجه به طبیعی بودن آن دارای جایگاه ویژه ای می‌باشد. هدف از این پژوهش بهینه سازی شرایط استخراج استویوزید از برگ‌های گیاه استویا (میزان حلال، دما و زمان) و بررسی اقلیم‌های متفاوت بر روی میزان غلظت استویوزید می‌باشد.

**روش تحقیق:** در ابتدا بهینه سازی استخراج استویوزید (میزان حلال، دما و زمان) صورت گرفته سپس نتایج بر روی گیاهان پرورش یافته در سه ناحیه با اقلیم متفاوت (اصفهان: معتدل و کوهستانی، شهرکرد: سرد و کوهستانی و شیراز: گرم و کوهستانی) اعمال شد و در نهایت میزان غلظت استویوزید با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج و بحث:** با توجه به نتایج به دست آمده بهترین شرایط استخراج در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و حجم ۱۶۰ میلی‌لیتر از حلال (اتانول) می‌باشد؛ در ادامه با اعمال این نتایج بر روی گیاهان رشد داده شده درسه شهر اصفهان، شیراز و شهرکرد نتایج بدست آمده نشان داد که شرایط اقلیمی می‌تواند تاثیرگذار بر روی محصول باشد به طوری که در این میان گیاهان پرورش یافته در اصفهان بیشترین سطح و راندمان تولید تن در هکتار و در مقابل از بیشترین ناخالصی بر خوردار می‌باشد در حالیکه گیاهان پرورش یافته در شیراز دارای کمترین راندمان تولید تن در هکتار و دارای خلوص بالا می‌باشند.

**توصیه کاربردی/صنعتی:** با توجه به بالا رفتن مصرف شیرین‌کننده‌ی استویوزید و همچنین قیمت بالای شیرین‌کننده‌ی فوق، کشت و پرورش آن در کشور امری مهم محسوب می‌شود. نتایج این تحقیق نشان-دهنده‌ی تحقق کشت این گیاه در کشور و استخراج شیرین‌کننده‌ی استویوزید با استفاده از حلال می‌باشد؛ با این حال انجام پژوهش‌های بیشتر بر روی روش‌های استخراج دیگر نیز امری ضروری و مهم می‌باشد.




Archive of SID

www.SID.ir

## ۱. مقدمه

طبق آمار وزارت بهداشت دو میلیون نفر از افراد ۲۵ تا ۶۵ سال در ایران دچار بیماری دیابت هستند. به علاوه این بیماری ششمین علت مرگ و میر در دنیا می‌باشد و به میزان ۵ تا ۱۰ سال از عمر افراد کم می‌کند (Otroshy & Mokhtary, 2014). همچنین براساس نتایج اعلام شده توسط سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۳۰ درصد ساکنین خاورمیانه دچار اضافه وزن می‌باشند. (Farokhzad & Bagheri, 2004). با توجه به مسائل فوق در سرتاسر جهان تمایل افراد برای استفاده از محصولات کم کالری و بدون قند در حال افزایش است. در این بین گیاه استویا به عنوان یک شیرین کننده‌ی طبیعی با شیرینی تقریبی ۲۰۰ تا۳۰۰ برابر نسبت به شکر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Koyama *et al.*, 2004). برگ استویا منبع گلیکوزیدهای[۱] مشتق ترپنی[۲] استویول[۳] مثل استویوزید و ربادیوزید A[۴]همراه با اجزاء بسیار جزئی ربادیوزید B، C، D و E، استویول بیوزید[۵]، دولکوزیدA[۶] ، ایزواستویول[۷] و دی‌هیدروایزواستویول[۸] می‌باشد (Koyama *et al.*, 2004). این مواد حدود ۵ تا ۱۰ درصد وزن برگ خشک را شامل می‌شوند و به حرارت پایدار هستند و ۲۰۰ تا ۳۰۰ برابر شیرین‌تر از قند چغندرقند می‌باشند ( Jaroslov *et al.*, 2007). فیلیپس[۹] در سال ۱۹۸۹ نشان داد که مطلوب‌ترین فرآیند استخراج شامل چهار مرحله: استخراج با حلال و یا با آب، تبادل یونی، ته نشینی با تصفیه و پس از آن تبلور و خشک کردن می‌باشد. (Brandle *et al.*, 1998). تا به حال در حدود ۱۵۰ اختراع با عنوان تصفیه در ژاپن به ثبت رسیده است. مراحل اساسی این فرایندها شامل استخراج، جدا سازی و تصفیه می‌باشد؛ در اغلب فرایندها از حلال‌های آلی و انعقاد دهنده‌ها استفاده شده است ( Balsini *et al.*, 2008). آب، متانول، n-بوتانول، اتانول و الکل چرب برای استخراج استویوزید از برگ استویا استفاده شده‌اند (De *et al.*, 2013). در مطالعه‌ی اخیر Rai و همکاران در سال ۲۰۱۲ به ارزیابی شرایط بهینه برای استخراج استویوزید از استویا با استفاده از آب پرداخته‌اند. نتایج نشان می‌دهد که بهترین شرایط برای استخراج، دمای ۷۸ درجه سانتی‌گراد، زمان حرارت‌دهی ۵۶ دقیقه و نسبت برگ به آب ۱:۱۴ وزنی-حجمی بوده است (Ray *et al.*, 2012). متانول برای استخراج استویوزید از برگ‌های استویا در مقایسه با آب کارایی بیشتری نشان داده است (Puri *et al.*, 2011a). روش‌های تجزیه‌ای مختلفی برای ارزیابی مقدار و توزیع گلیکوزیدهای شیرین دی‌ترپنوئید[۱۰] در گیاه استویا ربادیانا وجود دارد. که شامل کروماتوگرافی لایه نازک[۱۱]، کروماتوگرافی قطره‌ای جریان مخالف[۱۲]، کروماتوگرافی لایه‌ای با فشار بالا[۱۳]، الکتروفورز موئین[۱۴] می‌باشند. استویوزید و ربادیوزید A[۱۵] با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بعد از تبدیل آن‌ها به استر بروموفنسیل[۱۶] بررسی شده‌اند (Puri *et al.*, 2011). هدف از پژوهش فوق بهینه سازی شرایط استخراج و همچنین بررسی تاثیر آب و هوا بر میزان شیرینی و خلوص استویوزید می‌باشد.

## ۲. مواد و روش ها

### ۲-۱. مواد اولیه

برگ استویا از شرکت گلسار، استاندارد استویوزید با خلوص ۹۸٪ از شرکت سیگما، استونیتریل، متانول و اسید استیک از شرکت مرک، اتانول از شرکت صنایع شیمیایی اتانول نصر (خلوص ≤ ۹۹/۴ ، وزن مخصوص ۰/۷۹۶۲)، فیلتر با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر از شرکت سرینگ و کاغذ صافی از شرکت بکو تهیه شد.

### ۲-۲. آماده سازی نمونه

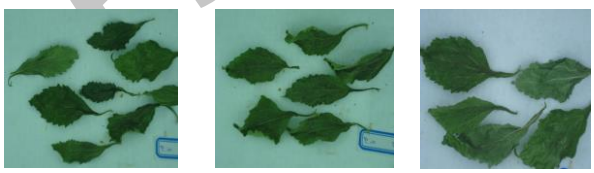
در ابتدا برگ‌های خشک استویای دریافتی که از شرکت گلسار شمال خریداری شده را توسط آسیاب خانگی پودر و مخلوط کرده و از الک آزمایشگاهی ۸ و ۱۸میکرون عبور داده تا اندازه‌ی ذرات در طول آزمایش یکسان باشد، پودر برگ روی مش ۱۸ را جدا کرده و در طی پژوهش مورد استفاده قرار گرفته است.

1. Glycosides
2. Terpene
3. Steviol
4. Rebaudioside A
5. Steviolbioside
6. Dulcoside A
7. Isosteviol
8. Dihydroisosteviol
9. Phillips
10. Diterpenoid
11. Thin layer chromatography
12. Droplet counter-current chromatography
13. Over-pressured layer chromatography
14 .Capillary electrophoresis
15. Rebaudioside A
16. Bromophenacyl esters



Archive of SID
www.SID.ir

**۲-۲-۱. آماده سازی گیاهان پرورش داده شده.** گیاهان دریافتی که بوسیله‌ی کشت بافت تکثیر شده بودند را از شرکت گلسار شمال در استان گیلان تحویل گرفته، تحت شرایط مناسب در گلدان کاشت شد و درسه شهر اصفهان، شهرکرد و شیراز با شرایط اقلیمی و آب و هوایی متفاوت که عبارت‌اند از اصفهان: معتدل و کوهستانی، شهرکرد: سرد و کوهستانی و شیراز: گرم و کوهستانی قرار داده شد. گیاهان پس از طی مدت زمان لازم برای رشد جمع‌آوری شده و جداسازی برگ‌ها از ساقه‌ها انجام گرفت، برگ‌ها در آون تحت دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتیگراد در مدت زمان ۴ ساعت خشک شده سپس از هر منطقه جداگانه برای بررسی خصوصیات برگ‌ها به وسیله دوربین دیجیتال Nikon Coolpix p600 عکس گرفته و بعد به ترتیب مانند کار انجام شده بر روی برگ‌های خشک، در ابتدا برگ‌ها پودر شده، الک شده و در طی پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.



اصفهان شهرکرد شیراز

**شکل۱.** عکس برگ خشک شده گیاهان پرورش یافته در اصفهان، شهرکرد، شیراز.

**۲-۳. بهینه سازی شرایط استخراج**

تیمارهایی که برای این آزمون در نظر گرفته شد شامل : دما، زمان و حجم حلال می باشد. به دلیل اینکه محیط الکلی می‌باشد نیازی به اندازه‌گیری pH نیست. سپس از محلول الکلی ۵۰ درصد (طبق نتایج بدست آمده از تحقیقات آسترکی و همکاران در سال ۲۰۱۲) حجم های ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰ و ۱۶۰ میلی‌لیتر استفاده کرده و استخراج‌ها در طی زمان‌های ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه و دماهای ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد از طریق اعمال روش حرارت‌دهی بوسیله‌ی حمام آب گرم و بکارگیری همزن مکانیکی برای اطمینان از حرارت‌دهی یکسان انجام گرفت. در هر یک از استخراج‌ها پس از اتمام مدت زمان حرارت‌دهی، بوسیله‌ی کاغذ صافی محلول استخراجی صاف شده و به یک ظرف نمونه در بسته و تاریک انتقال داده شد، سپس هر یک را نام گذاری کرده و تا زمان تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در یخچال نگهداری شد. قابل ذکر است که محدوده‌های در نظر گرفته شده با توجه به مقرون به صرفه بودن در صنعت و جنبه‌ی اقتصادی آنها می‌باشد. شرایط استخراج‌ها و میزان استویوزید حاصله در جدول (۱) مشاهده می‌شود.

**۲-۴. تعیین میزان شیرین‌کننده**

آزمون تعیین میزان شیرین‌کننده‌ی استویا بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا که ساخت شرکت ناور آلمان و ستون $c_{18}$ ساخت شرکت مچری نایژل آلمان انجام شد. فاز متحرک شامل استونیتریل/ آب (۶۰ / ۴۰ ) و با سرعت ۱میلی‌لیتر بر دقیقه بوده و دمای ستون در ۲۸ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد و دتکتور UV در طول موج ۲۵۴ nm به کار برده شد. حجم نمونه‌ی تزریق شده به دستگاه در هر مرتبه ۲۰ میکرولیتر بوده و هر نمونه قبل از تزریق از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. برای شروع آزمایش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در ابتدا ۰/۱ گرم از استاندارد را در ۱۰ سی‌سی آب مقطر حل کرده بدین صورت محلول استوک با رقت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بدست آمد. سپس از این محلول استوک ۳ رقت مختلف دیگر نیز تهیه شد و جهت رسم منحنی کالیبراسیون به همراه محلول استوک به دستگاه HPLC تزریق گشت. پس از رسم منحنی کالیبراسیون بر اساس سطح زیر نمودارهای بدست آمده و غلظت آنها، شرایط فوق برای نمونه‌های پرورش یافته در شهرهای مختلف مورد استفاده قرار گرفت.

**۲-۵. استخراج از برگ‌های پرورش یافته**

با توجه به شرایط بهینه به دست آمده در قسمت ۳-۳، استخراج از برگ‌های پرورش یافته در اقلیم‌های مختلف صورت گرفت.

**۲-۶. بررسی میزان شیرین کننده و ناخالصی برگ‌های پرورش یافته**

عصاره‌ی استخراجی به HPLC تزریق و نتایج ثبت و بررسی شد. برای بررسی میزان ناخالصی عصاره‌ی بدست آمده از این گیاهان، کدورت سنج (ساخت کمپانی هانا، مدل $H_1$ 93703، ساخت کشور رومانی) مورد استفاده قرار گرفت.



Archive of SID
www.SID.ir

### ۲-۷. آنالیز آماری

برای رسم منحنی‌های مربوط به نتایج بدست آمده از نرم افزار اکسل استفاده شد. همچنین برای بررسی سطوح برگ‌ها از نرم افزار Image proplus ver 6 استفاده گردید.

**جدول ۱.** شرایط استخراج و میزان استویوزید در نمونه برگ های خشک استویا . دورهمزن rpm ۶ ، اتانول ۵۰٪ ، وزن نمونه برگ ۱۰ گرم ، حرارت دهی بوسیله حمام آب گرم.

| نام گذاری نمونه ها | مدت زمان حرارت دهی(دقیقه) | دما (درجه سانتی گراد) | حجم حلال اضافه شده(میلی لیتر) | میلی گرم استویوزید در ۱۰ گرم |
|---|---|---|---|---|
| $A_1$ | ۱۰ | ۳۵ | ۱۰۰ | ۵۶ |
| $A_2$ | ۱۰ | ۴۰ | ۱۰۰ | ۶۱ |
| $A_3$ | ۱۰ | ۴۵ | ۱۰۰ | ۶۲ |
| $A_4$ | ۱۰ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۴۵ |
| $A_5$ | ۱۰ | ۳۵ | ۱۲۰ | ۶۰ |
| $A_6$ | ۱۰ | ۴۰ | ۱۲۰ | ۶۲/۴ |
| $A_7$ | ۱۰ | ۴۵ | ۱۲۰ | ۶۱/۲ |
| $A_8$ | ۱۰ | ۵۰ | ۱۲۰ | ۶۶ |
| $A_9$ | ۱۰ | ۳۵ | ۱۴۰ | ۶۸/۶ |
| $A_{10}$ | ۱۰ | ۴۰ | ۱۴۰ | ۶۵/۸ |
| $A_{11}$ | ۱۰ | ۴۵ | ۱۴۰ | ۶۷/۲ |
| $A_{12}$ | ۱۰ | ۵۰ | ۱۴۰ | ۷۵/۶ |
| $A_{13}$ | ۱۰ | ۳۵ | ۱۶۰ | ۶۲/۴ |
| $A_{14}$ | ۱۰ | ۴۰ | ۱۶۰ | ۷۵/۲ |
| $A_{15}$ | ۱۰ | ۴۵ | ۱۶۰ | ۷۰/۴ |
| $A_{16}$ | ۱۰ | ۵۰ | ۱۶۰ | ۸۸ |
| $B_1$ | ۱۵ | ۳۵ | ۱۰۰ | ۶۳ |
| $B_2$ | ۱۵ | ۴۰ | ۱۰۰ | ۶۷ |
| $B_3$ | ۱۵ | ۴۵ | ۱۰۰ | ۷۲ |
| $B_4$ | ۱۵ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۶۹ |
| $B_5$ | ۱۵ | ۳۵ | ۱۲۰ | ۷۰/۸ |
| $B_6$ | ۱۵ | ۴۰ | ۱۲۰ | ۷۹/۲ |
| $B_7$ | ۱۵ | ۴۵ | ۱۲۰ | ۸۶/۴ |
| $B_8$ | ۱۵ | ۵۰ | ۱۲۰ | ۷۹/۳ |
| $B_9$ | ۱۵ | ۳۵ | ۱۴۰ | ۷۵/۶ |
| $B_{10}$ | ۱۵ | ۴۰ | ۱۴۰ | ۸۴ |
| $B_{11}$ | ۱۵ | ۴۵ | ۱۴۰ | ۸۵/۴ |
| $B_{12}$ | ۱۵ | ۵۰ | ۱۴۰ | ۷۶/۸ |
| $B_{13}$ | ۱۵ | ۳۵ | ۱۶۰ | ۷۶/۸ |
| $B_{14}$ | ۱۵ | ۴۰ | ۱۶۰ | ۷۸/۴ |
| $B_{15}$ | ۱۵ | ۴۵ | ۱۶۰ | ۹۴/۴ |
| $B_{16}$ | ۱۵ | ۵۰ | ۱۶۰ | ۹۲/۸ |
| $C_1$ | ۳۰ | ۳۵ | ۱۰۰ | ۷۰ |
| $C_2$ | ۳۰ | ۴۰ | ۱۰۰ | ۷۲ |
| $C_3$ | ۳۰ | ۴۵ | ۱۰۰ | ۷۷ |
| $C_4$ | ۳۰ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۷۷ |
| $C_5$ | ۳۰ | ۳۵ | ۱۲۰ | ۷۶/۸ |
| $C_6$ | ۳۰ | ۴۰ | ۱۲۰ | ۷۸ |
| $C_7$ | ۳۰ | ۴۵ | ۱۲۰ | ۷۸ |
| $C_8$ | ۳۰ | ۵۰ | ۱۲۰ | ۸۰/۴ |
| $C_9$ | ۳۰ | ۳۵ | ۱۴۰ | ۸۱/۲ |

Archive of



www.SID.ir

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $C_{10}$ | ۳۰ | ۴۰ | ۱۴۰ | ۹۳/۸ | $E_4$ | ۱۲۰ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۱۱۱ |
| $C_{11}$ | ۳۰ | ۴۵ | ۱۴۰ | ۹۸ | $E_5$ | ۱۲۰ | ۳۵ | ۱۲۰ | ۹۶ |
| $C_{12}$ | ۳۰ | ۵۰ | ۱۴۰ | ۱۰۳/۶ | $E_6$ | ۱۲۰ | ۴۰ | ۱۲۰ | ۹۹/۶ |
| $C_{13}$ | ۳۰ | ۳۵ | ۱۶۰ | ۹۶ | $E_7$ | ۱۲۰ | ۴۵ | ۱۲۰ | ۱۰۵/۶ |
| $C_{14}$ | ۳۰ | ۴۰ | ۱۶۰ | ۱۰۲/۴ | $E_8$ | ۱۲۰ | ۵۰ | ۱۲۰ | ۱۱۶/۴ |
| $C_{15}$ | ۳۰ | ۴۵ | ۱۶۰ | ۱۰۷/۲ | $E_9$ | ۱۲۰ | ۳۵ | ۱۴۰ | ۱۰۶/۴ |
| $C_{16}$ | ۳۰ | ۵۰ | ۱۶۰ | ۱۱۲ | $E_{10}$ | ۱۲۰ | ۴۰ | ۱۴۰ | ۱۰۷/۸ |
| $D_1$ | ۶۰ | ۳۵ | ۱۰۰ | ۷۷ | $E_{11}$ | ۱۲۰ | ۴۵ | ۱۴۰ | ۱۱۷/۶ |
| $D_2$ | ۶۰ | ۴۰ | ۱۰۰ | ۸۶ | $E_{12}$ | ۱۲۰ | ۵۰ | ۱۴۰ | ۱۳۱/۶ |
| $D_3$ | ۶۰ | ۴۵ | ۱۰۰ | ۹۰ | $E_{13}$ | ۱۲۰ | ۳۵ | ۱۶۰ | ۱۱۶/۸ |
| $D_4$ | ۶۰ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۹۵ | $E_{14}$ | ۱۲۰ | ۴۰ | ۱۶۰ | ۱۲۴/۸ |
| $D_5$ | ۶۰ | ۳۵ | ۱۲۰ | ۸۶/۴ | $E_{15}$ | ۱۲۰ | ۴۵ | ۱۶۰ | ۱۳۱/۲ |
| $D_6$ | ۶۰ | ۴۰ | ۱۲۰ | ۹۲/۴ | $E_{16}$ | ۱۲۰ | ۵۰ | ۱۶۰ | ۱۳۹/۲ |
| $D_7$ | ۶۰ | ۴۵ | ۱۲۰ | ۹۶ | | | | | |
| $D_8$ | ۶۰ | ۵۰ | ۱۲۰ | ۱۱۰/۴ | | | | | |
| $D_9$ | ۶۰ | ۳۵ | ۱۴۰ | ۹۸ | | | | | |
| $D_{10}$ | ۶۰ | ۴۰ | ۱۴۰ | ۱۰۷/۸ | | | | | |
| $D_{11}$ | ۶۰ | ۴۵ | ۱۴۰ | ۱۰۶/۴ | | | | | |
| $D_{12}$ | ۶۰ | ۵۰ | ۱۴۰ | ۱۱۳/۴ | | | | | |
| $D_{13}$ | ۶۰ | ۳۵ | ۱۶۰ | ۱۱۲ | | | | | |
| $D_{14}$ | ۶۰ | ۴۰ | ۱۶۰ | ۱۱۸/۴ | | | | | |
| $D_{15}$ | ۶۰ | ۴۵ | ۱۶۰ | ۱۲۰ | | | | | |
| $D_{16}$ | ۶۰ | ۵۰ | ۱۶۰ | ۱۲۹/۶ | | | | | |
| $E_1$ | ۱۲۰ | ۳۵ | ۱۰۰ | ۸۷ | | | | | |
| $E_2$ | ۱۲۰ | ۴۰ | ۱۰۰ | ۹۷ | | | | | |
| $E_3$ | ۱۲۰ | ۴۵ | ۱۰۰ | ۱۰۱ | | | | | |

## ۳. نتایج و بحث

### ۳-۱. بهینه سازی شرایط و بررسی میزان شیرین کننده

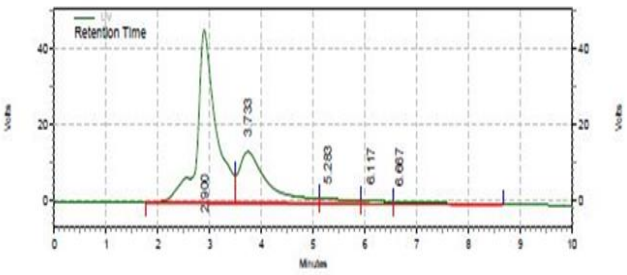
در شکل (۲) کروماتوگرام مربوط به تزریق نمونه استاندارد استویوزید بعد از رقت سازی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده می‌شود. سایر غلظت های تزریقی نمونه‌ها نیز به همین ترتیب آماده و به دستگاه تزریق شد و هر یک از کروماتوگرام‌ها بررسی شد. عصاره-های استخراج شده پس از آماده‌سازی برای تزریق توسط سرنگ با حجم ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شدند و طی زمان ۷ دقیقه پیک‌های مورد نظر حاصل گردید.

میزان استویوزید موجود در نمونه‌ها با مقایسه مساحت سطح زیر پیک استاندارد محاسبه شد :

Archive of SID



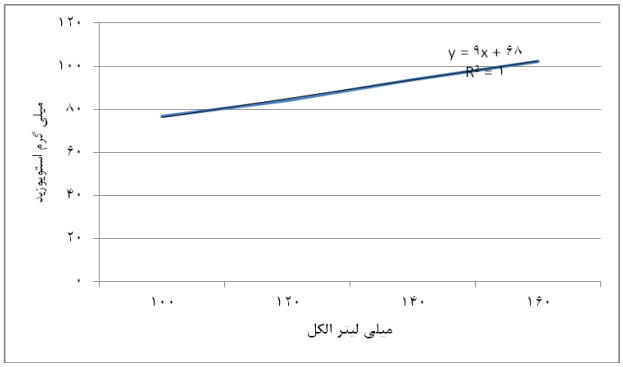
www.SID.ir




**شکل ۲.** کروماتوگرام مربوط به استاندارد استویوزید

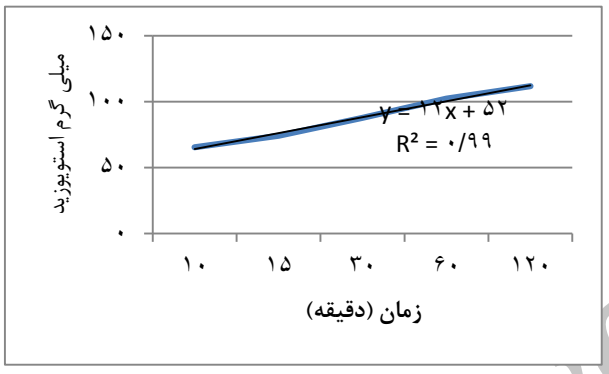
***۳-۱-۱. بررسی اثر میزان الکل بر میزان استخراج استویوزید.***

با توجه به شکل (۳)، با ثابت بودن متغییرها و متغییر بودن غلظت الکل، رابطه خطی بین استخراج استویوزید و میزان حلال وجود دارد و هر چه میزان مصرف حلال افزایش یابد با توجه به معادله‌ی به دست آمده میزان استویوزید استخراجی در محدوده‌ی میزان الکل ۱۰۰ تا ۱۶۰ میلی‌لیتر بر ۱۰ گرم برگ استویا افزایش می‌یابد و بالاتر از این مقدار به حد ثابت خود می‌رسد. طبق قانون فیک غلظت الکل به عنوان حلال می‌تواند بر سرعت و میزان استخراج استویوزید از برگ استویا موثر باشد. قطعا هرچه مقدار اولیه‌ی الکل بالاتر باشد غلظت نهایی استویوزید در فاز الکلی کمتر بوده و مقدار بیشتری از استویوزید برگ استویا استخراج خواهد شد. بنابراین تاثیر میزان حلال برای انتخاب شرایط بهینه‌ی اقتصادی در استخراج استویوزید موثر است که در این پایان‌نامه هدف از انتخاب پارامتر میزان حلال انتخاب میزان بهینه در صورت تبدیل نتایج تحقیق به فرایند تجاری است.




**شکل۳.** بررسی اثر میزان الکل بر میزان استخراج استویوزید

***۳-۱-۲. بررسی اثر زمان بر میزان استخراج استویوزید.*** با توجه به شکل (۴)، با ثابت بودن متغییرها و متغییر بودن زمان، بین میزان استخراج استویوزید و زمان ارتباط خطی وجود دارد و هر چه زمان افزایش یابد با توجه به معادله‌ی به دست آمده میزان استویوزید استخراجی در محدوده‌ی زمان ۱۰ تا ۱۲۰ دقیقه بر ۱۰ گرم برگ استویا افزایش می‌یابد و بالاتر از این مقدار به حد ثابت خود می‌رسد. طبق قانون فیک یکی از عواملی که عامل ایجاد انتشار است اختلاف غلظت است و از آنجایی که با گذر زمان اختلاف غلظت بین ماده‌ی حل‌کننده و برگ کاهش می‌یابد انتظار می‌رود در زمان بینهایت به حد تعادل برسد بنابراین تاثیر زمان برای انتخاب زمان بهینه اقتصادی در استخراج استویوزید موثر است که در این پایان‌نامه هدف از انتخاب پارامتر زمان انتخاب زمان بهینه در صورت تبدیل نتایج تحقیق به فرایند تجاری است.

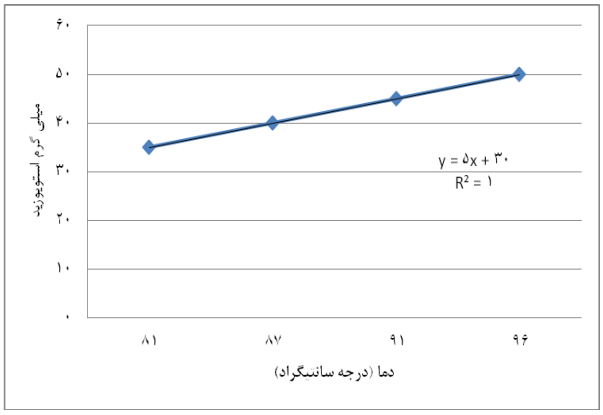



**شکل۴.** بررسی اثر زمان بر میزان استخراج استویوزید.

***۳-۱-۳. بررسی اثر دما بر میزان استخراج استویوزید.*** با توجه به شکل (۵)، با ثابت بودن متغییرها و متغییر بودن دما، ارتباط خطی بین دما و میزان استخراج استویوزید وجود دارد و هر چه دما افزایش یابد با توجه به معادله‌ی به دست آمده میزان استویوزید استخراجی در محدوده دمای ۳۵ تا ۵۰ درجه بر ۱۰ گرم برگ استویا افزایش می‌یابد و بالاتر از این مقدار به حد ثابت خود می‌رسد. دما با کاهش ویسکوزیته و درنهایت با افزایش ضریب دیفوزیون می‌تواند بر میزان استخراج استویوزید موثر باشد. با توجه به قانون فیک همان‌طور که انتظار می‌رود دما باعث افزایش میزان استخراج شده است. از آنجایی-که سایر پارامترهای موثر بر قانون فیک ثابت مانده است، تنها پارامتری که تغییر یافته میزان ضریب دیفوزیون می‌باشد.



Archive of SID
www.SID.ir




**شکل۵.** بررسی اثر دما بر میزان استخراج استویوزید.

### ۳-۲. استخراج استویوزید از برگ استویا پرورش یافته در اقلیم‌های مختلف

با توجه به بهینه سازی شرایط در بخش ۳-۱، استخراج از برگ‌های پرورش یافته در شرایط یکسان شامل: دور همزن ۶ rpm، مدت زمان حرارت‌دهی ۱۲۰ دقیقه، دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، حلال اتانول ۵۰ درصد، حجم حلال ۱۶۰ میلی‌لیتر، وزن نمونه برگ ۱۰ گرم و با روش حرارت‌دهی حمام آب گرم صورت گرفت.

***۳-۲-۱. نتایج حاصل از استخراج استویوزید در نمونه برگ-های پرورش یافته.*** با توجه به جدول ۲ در مورد ویژگی‌های برگ گیاهان پرورش یافته که شامل میلی‌گرم استویوزید استخراجی از ۱۰ گرم برگ نمونه‌ی گیاه پرورش یافته در سه شهر، سطح نمونه برگ گیاهان و میزان کدورت و ناخالصی هر نمونه می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت بیشترین میزان استویوزید استخراجی در ۱۰ گرم پودر برگ به ترتیب متعلق به اصفهان، شهرکرد و شیراز بوده و بیشترین سطح و در نتیجه بیشترین راندمان تولید تن در هکتار هر بوته متعلق به استان اصفهان و پس از آن به ترتیب متعلق به شیراز و شهرکرد می-باشد. از روی بررسی آزمون کدورت سنجی مشخص شد که اصفهان دارای مواد کدورت‌زای بیشتر در نتیجه میزان ناخالصی بیشتر بوده و پس از آن به ترتیب متعلق به شهرکرد و شیراز می باشد. و در کل می‌توان نتیجه گرفت راندمان تولید تن در هکتار هر بوته در اصفهان بالا بوده ولی میزان ناخالصی موجود در گیاه شهر اصفهان بیشتر است و در مقابل شیراز با وجود کم بودن راندمان تن در هکتار هر بوته، از ناخالصی کمتری برخوردار است. در طی تحقیقات گذشته نیز اثر شرایط اقلیمی بر روی میزان گلیکوزیدهای استویا به اثبات رسیده است (Jeffrey & Alejandro, 1999).

**جدول ۲.** میزان سطح برگ‌ها ($m^2$) و میزان غلظت استویوزید استخراجی (میلی‌گرم) و کدورت در نمونه‌های برگ پرورش یافته در شرایط استخراج بهینه.

| نام شهر | میلی‌گرم استویوزاید در ۱۰ گرم | سطح برگ ($m^2$) | کدورت ( FTU ) |
|---|---|---|---|
| اصفهان | ۲۰۳/۲ | ۲۵۰۱۵۹/۹۴±۴۹/۳۳ | ۶۶ |
| شیراز | ۱۲۳/۲ | ۱۳۷۹۲۹/۴۰±۳۰/۰۰ | ۳۰/۱۱ |
| شهرکرد | ۱۸۰/۸ | ۸۰۹۳۸/۹۷±۴۱/۶۲ | ۳۲/۶۳ |

## ۴. نتیجه گیری

بر طبق مشاهدات و بررسی‌های انجام شده مشخص شد که دما، زمان و حجم الکل بر میزان غلظت استویوزید استخراجی تاثیرگذار است و با افزایش هر یک از پارامترهای موجود میزان استخراج استویوزید افزایش یافته و پارامترهای مد نظر روند صعودی بر میزان استخراج را نشان داده است. از آنجایی که محدوده‌های در نظر گرفته شده با توجه به مقرون به صرفه بودن در صنعت بوده است بهترین نتیجه استخراج از غلظت الکل ۱۶۰ میلی‌لیتر و زمان ۱۲۰ دقیقه و دمای ۵۰ درجه بوده و یک روند صعودی را در پی داشته است. درنتیجه استویوزید حساس به زمان، دما و میزان الکل نبوده و با افزایش هر یک از آنها میزان استخراج استویوزید افزایش یافته است. با بررسی گیاهان پرورش داده شده در سه منطقه از ایران مشاهده شد که اصفهان بیشترین راندمان تولیدی تن در هکتار را داشته و پس از آن به ترتیب شیراز و شهرکرد می‌باشد. از بررسی عصاره استخراج شده از برگ گیاهان این سه شهر مشخص شد که بیشترین مواد کدورت‌زا و ناخالصی‌های موجود به ترتیب متعلق به اصفهان، شهرکرد و شیراز و بیشترین میزان استویوزید استخراجی نیز به ترتیب متعلق به اصفهان، شهرکرد و شیراز است. بنابراین گزارش شد با اینکه اصفهان راندمان تولید تن در هکتار و غلظت استویوزید بالایی دارد ولی دارای



Archive of SID
www.SID.ir

ناخالصی بیشتری بوده و در مقابل شیراز دارای راندمان تولید تن در هکتار کمتر و ناخالصی کمتری می باشد.

## ۵. منابع


Astraki, R., Azizi, M., and Hojjatoleslami, M. 2012. Optimization of Extraction and Purification Stevioside. *Master's thesis (Islamic Azad University of Shahrekord)*., 3-10.

Balsini, S., Najafi, A. and Hadad Khodaparast, M. 2008. Membrane separation method for the sweetener stevia leaves. *National Conference functional food*., 532-534.

Brandle, J.E., Starratt, A. N. and Gijzen, M. 1998. Stevia rebaudiana: its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*., 78: 527-533.

De, S., Mondal, S. and Banerjee, S. 2013. Introduction to stevioside. Stevioside technology, applications and health. *John Wiley*., 1-27.

Farokhzad, H. and Bagheri, A. 2004. Obesity and cardiovascular risk factors in Iranian children. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid*., 2: 175-183.

Jaroslov, P., Brabora, H. and Tuulia, H. 2007. Characterisation of steviol rebaudiana by choprehensive Tow dimensional liquid chromatography Time of Flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*., 1150: 85-92.

Jeffrey, G. and Alejandro, C. 1999. Seed germination in stevia rebaudiana. Reprinted frome Perspeetives on New Crops and new Uses. *ASHS Press, Alexandria, VA. Retrieved from http://www. lni. unipi. it/stevia/stevia/v4-510. htm***,** 510-511.

Koyama, E., Kitazawa, K., Ohori, Y., Izawa, O., Kakegawa, K. and Ul, M. 2003. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food and Chemical Toxicology*., 41: 359-374.

Otroshy, M. and Mokhtary, A. 2014. *Stevia and its health benefits*. Nosuh publications, Isfahan, PP. 9-58.

Puri, M., Kaur, A., Barrow, C. J. and Singh, R. S. 2011a. Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by Staphylococcus xylosus MAK2 in a stirred tank reactor. *Applied microbiology and biotechnology*., 89: 715-722.

Puri, M., Sharma, D. and Tiwari, A. K. 2011. Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances*., 29: 781-791.

Ray, C., Majumdra, G. and De, S. 2012. Optimization of process parameters for water extraction of stevioside using response surface methodology. *Seperation Science and Technology*., 47:1014-1022.


Archive of SID



www.SID.ir